

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : **03-197492**

(43) Date of publication of application : **28.08.1991**

(51) Int.Cl.

C07K 5/10
A61K 37/02
C12P 17/02
//(C12P 17/02
C12R 1:01)

(21) Application number : **02-205269**

(71) Applicant : **BRISTOL MYERS SQUIBB CO**

(22) Date of filing : **03.08.1990**

(72) Inventor : **KONISHI MASATAKA
HANADA MINORU
NISHIYAMA YUJI**

(30) Priority

Priority number : **89 389479** Priority date : **04.08.1989** Priority country : **US**

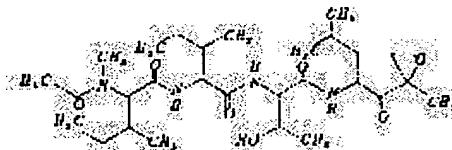
(54) **BU-406IT**

(57) Abstract:

NEW MATERIAL: A compound of formula. The compound has following physical and chemical properties, white amorphous powder; easily soluble in methanol, methylene chloride and ethyl acetate, and insoluble in water; positive to iodine vapor, ammonium molybdate-sulfuric acid solution and Ridon Smith's reagent, and negative to ninhydrine and anthrone reagent.

USE: Antitumor antibiotics.

PROCESS: *Actinomyces* Q996-17 (ATCC-53904) strain, or BU-406IT-producing variant or modification strain thereof, is cultured under the depth aerobic condition in an aqueous nutritive culture medium including of C and N as nutrients.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑯ 公開特許公報 (A) 平3-197492

⑯ Int. Cl. 5

C 07 K 5/10
 A 61 K 37/02
 C 12 P 17/02
 //C 12 P 17/02
 C 12 R 1:01)

識別記号

ZNA
 ADU

庁内整理番号

8318-4H
 8615-4C
 8931-4B
 8515-4B

⑯ 公開 平成3年(1991)8月28日

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全12頁)

⑯ 発明の名称 BU-4061T

⑯ 特願 平2-205269

⑯ 出願 平2(1990)8月3日

優先権主張 ⑯ 1989年8月4日⑯米国(US)⑯389479

⑯ 発明者 小西 正隆 神奈川県川崎市宮前区有馬7-5-7

⑯ 発明者 花田 實 東京都品川区西五反田7丁目15-4

⑯ 発明者 西山 祐二 東京都台東区蔵前2-15-7-301

⑯ 出願人 ブリストル・マイヤーズ スクイブ カンパニー アメリカ合衆国ニューヨーク州 10154 ニューヨーク

⑯ 代理人 弁理士 斎藤 武彦 外2名

明細書の添付 (内容に変更なし)

明細書

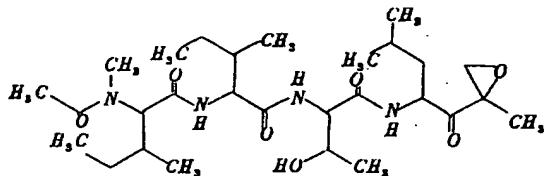
を有するBU-4061Tの製造方法。

1. [発明の名称]

BU-4061T

2. [特許請求の範囲]

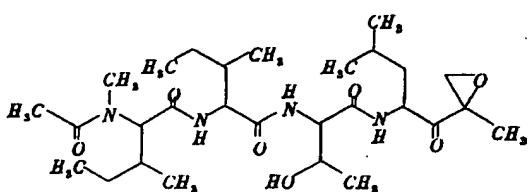
1. 次式を有し、BU-4061Tと命名された化合物。



2. 放線菌属に属するBU-4061T生産菌を培養し、

培養物からBU-4061Tを採取することを特徴とする

次式:



3. 放線菌Q996-17(ATCC-53904)株

またはそのBU-4061T産生変異株または変種株を、深

部好気条件下、炭素及び窒素の資化源を含有する水性栄養

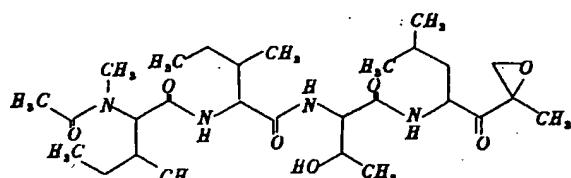
培地中で実質的な量のBU-4061Tが該培地中に該微

生物によつて産生されるまで培養し、次に培養液から該

BU-4061Tを採取するものである請求項2に記載の

方法。

4. 次式:



のBU-4061Tを有効成分とする腫瘍阻止用医薬組成物。

5. 有効成分のBU-4061Tと不活性で医薬として許容される担体または希釈剤を含んでいる請求項4に記載の組成物。

6. 炭素及び窒素の資化源を含有する水性栄養培地で培養すると、回収可能な量の抗生物質BU-4061Tを产生することのできる放線菌属に属するATCC-53904菌。

3. [発明の詳細な説明]

(産業上の利用分野)

本発明は、本明細書においてBU-4061Tと命名された新規な抗腫瘍抗生物質、その製造法及び実質的に純粋なBU-4061Tの単離精製法に関する。

(従来技術)

米国特許出願第165337号(1988年3月7日出願)には、次式:

-3-

てBU-4061Tを有効成分として含有する医薬組成物に関する。

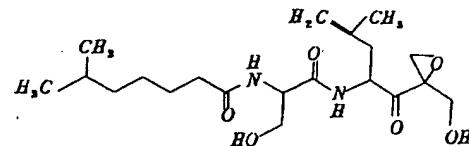
本発明を以下に更に詳しく説明する。

本微生物

BU-4061Tは、放線菌に属する菌株Q996-17またはそのBU-4061T産生変種または変異株を醸酵せしめることにより得られる。

その好ましい産生株で、Q996-17と命名されたものは、インド国アンドーラ プラデシュ州(Andhra Pradesh State, India)で採取された土壠サンプルより分離せしめられた。

本菌の培養特性及び生理学的特性は、Shirling & Gottlieb (Int. J. Syst. Bacteriol. 16: 313-340, 1966)及びGordonほか(J. Gen. Microbiol. 109: 69-78, 1978)の



のBU-3862Tと命名された醸酵産物の抗腫瘍抗生物質が開示されている。本BU-4061Tは、上記抗生物に幾つかの構造上の関連性を有している。

(課題の解決)

本発明は、BU-4061Tと命名された新規な抗腫瘍抗生物質に関する。本発明はまたBU-4061Tの醸酵による製造法に関し、特に、本明細書においてQ996-17(ATCC-53904)株と命名された新規な放線菌に属する菌を用いての製造法に関する。本発明は更にBU-4061Tの醸酵法による製造に用いる新規な微生物、そのBU-4061Tの抗腫瘍剤としての用途、そし

-4-

方法によつて調べられた。全細胞の加水分解物中のアミノ酸及び糖の分析は、Lechevalierほか(Biochem. Syst. Ecol. 5: 249-260, 1977)の方法によつて行なつた。メナキノン(menquinone)のサンプルは、Collinsほか(J. Gen. Microbiol. 100: 221-230, 1977)の方法によつて調製され、質量分析器で分析した。ミコール酸及びグリコール酸の検出試験は、それぞれMinnikinほか(J. Gen. Microbiol. 88: 200-204, 1975)及びUchida及びAida (J. Gen. Appl. Microbiol. 25: 169-183, 1979)の方法によつて行なつた。

形態学的性状

基生菌系は、長く、良く分枝し、桿状形態または球形のものへは断片化しない。気菌系は通常の判定用培地で

-5-

-6-

は形成されない。不完全な菌糸が、一部の特別な培地、例えばラビット ドゥング寒天 (*rabbit dung agar*) またはビタミン B 複合体を補つた麦芽エキス-酵母エキス 寒天でまれに生ずる。これらの菌糸は、次第に細くなる先端を持つ分生子柄束 (基底で 2-30 μm の幅) になつていて、分生子柄束の菌糸の先端あるいはその菌糸の部位での胞子の形成は見られない。

培養特性及び生理学的特性 (表 1 及び 2)：基生菌糸の色は、有機培地ではグレーイッシュ-オリーブであり、合成培地では無色又はライトイエローである。メラノイド色素は産生されない。生育温度範囲は、19°C~45°Cである。48°Cではいかなる生育も見られない。

細胞の化学的特性：

細胞全部を加水分解したものには、メソ-ジアミノピメリン酸、ガラクトース、マンノース、リボース及びラムノ

ースを含有していることから、本菌は細胞壁タイプ III 及び糖パターン C に属するものである。そのリン脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン類、ホスファチジルグリセロール及びホスファチジルイノシトールがあげられるところから、それはタイプ I- II に分類される。主要メナキンンは MK-9 (H₄) 及び MK-10 (H₄) である。ミコレートは存在しない。グリコレート試験は陰性であつた。

分類学上の位置

Q 996-17 株は、好気性中温性放線菌であり、胞子を形成しない。化学的な分類では、本菌は、ストレプトアロテイクス (*Streptoalloscichus*)、サツカロトリクス (*Saccharothrix*) 及びアクチノシネマ (*Actinomycetina*) に関連したものである。しかしながら、本菌は胞子形成の形態的特性で特徴付けされてないので、上記属のいずれにも分類することができない。かくして、本

- 7 -

- 8 -

菌 Q 996-17 は、同定されていない放線菌として記載するのが最もよい。

本放線菌株 Q 996-17 の生物学的に純粋な培養物は、*American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A.* に寄託されており、ATCC-53904 として微生物の永久保存株となつている。

本発明は、その特定の菌株あるいはその記載された性状の微生物の使用のみに限定されるものではないことは理解されるべきである。本発明は、通常の方法、例えば X-線、紫外線、ナイトロジエンマスターード類、フージにさらすこと等での処理によつて作ることのできる上記微生物のその他の BU-4061T 生産菌の変種または突然変異体をも含むことを特に意図している。

抗生素質の产生

BU-4061T は、水性栄養培地中深部好気条件下放線菌 Q 996-17 (ATCC-53904) 株またはその BU-4061T 生産変種株または突然変異株を培養することにより生産することができる。該微生物は、質化性の炭素源、例えば、トレハロース、D-キシロース、D-ソルビトール、可溶性でんぶん、D-リボース、D-メリピオース、D-マノノース、D-マンニトール、マルトース、ラクトース、D-フルクトース、グリセロール等を含有する栄養培地中で生育せしめられる。該栄養培地は、さらに質化性の窒素源、例えば、魚肉ミール、ペプトン、大豆フラワー、ピーナツミール、綿実ミール、コーンステイーブリカ、酵母エキスあるいはアンモニウム塩を含んでいるべきである。無機塩、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、リン酸塩等が必要なら加えられる。微量元素、例えば銅、マンガン、

- 9 -

-1025-

-10-

鉄、亜鉛等が、所望なら培地中に加えられるか、あるいはそれらは培地の他の成分の不純物として供給されたものであつてもよい。

BU-4061T の生産は、その生産菌の満足しうる生育がなしうるいかなる温度、例えば、19-45°Cでも効率的になすことができるが、25-35°Cで酸酵を行なうのが好ましく、最も好ましくは27-32°Cで行なうのがよい。一般的には抗生物質の生産は約3-7日間で行なわれる。

本酸酵は、各種の大きさのフラスコまたは実験用あるいは工業用のファメンテーター中で行なうことができる。タンク酸酵が行なわれる場合、斜面培養、ソイルカルチャー (soil culture) または凍結されている培養物の菌体を少量の培養用培地に接種して栄養プロセス中の休止期の接種物を生産することが好ましい。このような方法で活性な

-11-

BU-4061T は、白色の無定形粉末として得られる。そのものは、メタノール、メチレンクロライド及び酢酸エチルに非常によく溶け、水に実質的に不溶である。*BU-4061T* は、ヨク素蒸気、モリブデン酸アンモニウム-硫酸溶液及び *Rydon-Smith* 試薬に陽性を示し、ニンヒドリン及びアンスロン試薬に陰性である。*BU-4061T* の物理化学的性状は表1にまとめて示してある。本抗生物質は特徴的なUV吸収を示さなかつた。そのIRスペクトル (KBr錠剤、図1) は、強い1640及び1540 cm⁻¹での吸収を示しており、それは、*BU-4061T* がペプチド系抗生物質に属することを示唆している。*BU-4061T* の¹H-NMRスペクトル及び¹³C-NMRスペクトルはそれぞれ図2及び図3に示されている。*BU-4061T* の¹³C-NMRスペクトルは、次のものを含む28個の炭素原子の存在を示している：

-13-

接種物を得た後、*BU-4061T* の大量生産のための酸酵タンク培地中に無菌的に移す。その休止期の接種物を作る場合の培地は、その生産菌が良好に生育する限り、タンクにおけるものと同一でもあるいは異なるつてもよい。酸酵中の搅拌は機械式の搅拌機によつてなすことができ、消泡剤、例えばラード油またはシリコン油が必要なら加えられることができる。

酸酵培地中での*BU-4061T* の生産は、薄層クロマトグラフィーまたは細胞毒性アッセイによつて酸酵途中に容易に見ることができる。

酸酵培地からの*BU-4061T* 抗生物質の単離及び*BU-4061T* の精製は、通常の溶媒抽出法やクロマトグラフィー法によつて行なうことができる。好ましい単離精製法は、下記実施例2に具体的に示されたものである。

BU-4061T の物理化学的性状

-12-

10個のメチル (δ : 1.0.5, 1.1.1, 1.5.5, 1.5.6, 1.6.8, 1.7.8, 2.1.1, 2.2.1, 2.3.3, 3.2.1), 4個のメチレン (2.4.6, 2.4.7, 3.9.5, 5.2.4), 8個のメチン (2.5.1, 3.1.9, 3.6.2, 5.0.6, 5.6.4, 5.8.0, 6.1.5, 6.6.5), 1個の第四級体 (5.9.2) 及び5個のカルボニル炭素 (1.7.0.6, 1.7.0.8, 1.7.1.7, 1.7.2.1, 2.0.8.3)。

BU-4061T の分子式は、¹H-NMR、¹³C-NMR、マイクロアナリシス及びSIMS (m/z 577 ($M+Na$)⁺, 555 ($M+H$)⁺) により $C_{28}H_{50}N_6O_7$ とされた。

構造の研究

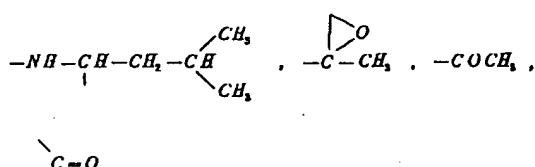
封管中で17時間*BU-4061T* を6N HClでもつて105°Cで加水分解した。その加水分解物を水で希釈し、エーテルで抽出した。分離せられた水性相を減圧下濃縮し、凍結乾燥し、158mgの無色油状残留物を得、これはTLC

-1026-

-14-

によつて三つのニンヒドリン陽性物質を含んでいた。それらのうちの二つは、その TLC 及びアミノ酸分析の挙動によりスレオニン及びイソロイシンと同定された。この残留物を Dowex 50W \times 4 (H^+ タイプ、100-200 メッシュ、 $\phi 1.5 \times 20 \text{ cm}$) のカラムにかけ、そのカラムを順次 0.03N、0.06N、0.1N、0.3N、0.6N、1N 及び 3N の塩酸で溶出した。0.06N HCl で溶出され築められたニンヒドリン陽性の分画を濃縮し、さらに Sephadex LH-20 ($\phi 2.2 \times 100 \text{ cm}$) のカラムのクロマトグラフィーにかけ、12%のスレオニン塩酸塩の無色シロップを得た。0.3N HCl での溶出液を減圧下濃縮し、イソロイシン及び未同定のニンヒドリン陽性物質の混合物を得た。 Dowex 50W \times 4 (ビリジンタイプ、100-200 メッシュ、 $\phi 2.0 \times 75 \text{ cm}$) のカラムクロマトグラフィー法によりそれらを分離した。未知のアミノ酸が 0.1N ビリジ

及び¹³C-NMR 及び¹H-¹H COSY スペクトル(表3)の分析は、L-トレオニン、L-イソロイシン及びN-メチルイソロイシンに加えて次なる部分構造が存在していることを示している：



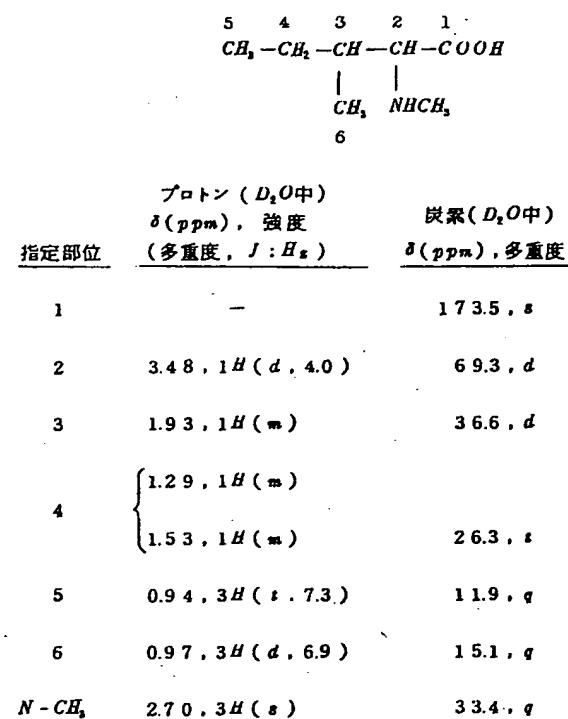
これらのフラグメントの配列は、*BU-4061T*の¹³C-¹HロングレンジCOSY 及び ESR-MSスペクトルを分析して明らかにされ、下記に示す構造が、本抗生物質のものとして決められた。

ン-ギ酸緩衝液(pH 3.1)で溶出された。溶出液を減圧下濃縮し、*Sephadex LH-20*のクロマトグラフィー法により脱塩した。適切な分画を溶媒蒸発処理し、1.2.5 mgの白色粉末を得た。この物質は表2に示されるようその SIMSスペクトル(m/z : 168 ($M+Na$)⁺、146 ($M+H$)⁺)及び¹H-NMRスペクトル及び¹³C-NMRスペクトルにより N -メチルイソロイシンであると決定された。0.2Nピリジン-ギ酸緩衝液(pH 3.1)で溶出されたイソロイシン含有分画を減圧下に溶媒蒸発し、残留物をエタノール水溶液から再結晶し、5.0 mgの無色針状晶を得た。スレオニン及びイソロイシンのキーラリティは、キラルHPLC(*TSK*ゲル *ENANTIO L1*、移動相: 1 mM $CuSO_4$ 、検出: 254 nm、温度: 50°C)を用いて決定された。この結果はそれら両方は L 配置であることを明確に示している。*BU-4061T*の¹H-NMR

表 1 BU-4061T の物理化学的性状

性状	：白色粉末
M.P.	：107—109℃
$[\alpha]_D^{24.5}$	： $-6.6.1 \pm 0.4$ (c 0.5, M_eOH)
$UV \lambda_{max}^{M_eOH} nm$	：末端吸收
$IR \nu^{KB_r} cm^{-1}$	：3300, 2950, 1720, 1640, 1540
SIMS 実測値 m/z :	577($M+Na$) ⁺ , 555($M+H$) ⁺
マイクロアナリシス :	
計算値 $C_{28}H_{50}N_6O_7$:	C 60.62 H 9.09 N 10.10
実測値	：C 60.45 H 9.15 N 10.18
TLC, SiO_2	： $CH_2Cl_2-M_eOH$ 9:1 R_f 0.60 ヘキサンアセトニ 1:1 0.27

表 2 1H -NMR & ^{13}C -NMR スペクトル: N-メチルイソロイシン



-19-

表 3 1H -NMRスペクトル: BU-4061T

δ ppm (CDC ₆ 中)	強 度	多 重 度 (J:Hz)	指 定 部 位
7.3 6	1H	d (7.7)	NH
7.2 9	1H	d (8.1)	NH
6.9 3	1H	d (7.7)	NH
4.6 8	1H	d (11.4)	CH
4.5 2	1H	d d d	CH
4.4 6	1H	dd (29, 7.7)	CH
4.2 6	1H	d d	CH
4.2 4	1H	d _q (29, 65)	CH
3.3 1	1H	d (4.9)	CH ₂
2.8 8	1H	d (4.9)	
2.9 8	3H	s	N - CH ₃
2.1 1	3H	s	CO - CH ₃
2.0 8	1H	m	CH
1.9 6	1H	m	CH
1.6 4	1H	m	CH
1.3 6 - 1.5 5	2H	m	CH ₂
1.5 1	3H	s	\geq C - CH ₃
1.1 4 - 1.3 6	2H	m	CH ₂
1.1 0	3H	d (6.5)	CH ₂

-30-

δ ppm (CDCls中)	多重度		指定部位
	强度	(J: Hz)	
0.94-1.02	2H	m	CH ₂
0.92	3H	d (3.7)	CH ₃
0.90	3H	d (3.7)	CH ₃
0.82-0.84	12H	m	CH ₃ × 4

生物活性

マウス及びヒトのセルラインに対する in vitro 細胞
毒活性及びマウスに対する in vivo の活性について BII
- 4061T の試験を行なつた。

B16-P10 (マウスマラノーマ) 細胞及びMoser (ヒト結直腸癌) 細胞は、胎児牛血清 (FCS, 10%) 及びカナマイシン ($60 \mu\text{g}/\text{ml}$) を補なわれた富化 Eagle 最小必須培地において対数期まで生育させ、一方 HCT-116 (ヒト結腸癌) は、FCS (10%)、ベニシリソ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) 及びストレプトマイシン ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)

を補なわれた *Mc Coy's 5A* 培地中で生育させた。 *B16* - *F10*、 *Mosser* 及び *HCT-116* の各細胞を収穫し、 それぞれ 3×10^4 、 6×10^4 及び 6×10^4 細胞/ ml の接種量で試験化合物を入れた 96 - ウエルのマイクロタイマーの各ウエル中に植え込んだ。 それらを、 5% CO_2 及び 95% の空気の湿度付与した 界囲気中で 72 時間 37°C でインキュベーションした。 腫瘍細胞に対する細胞毒性活性は、 生細胞を染色した後 540 nm での比色測定によつて測定した。 *BU-4061T* は、 それぞれ *B16* - *F10* 細胞及び *HCT-116* 細胞に対して非常に良好な細胞毒性活性を示し、 IC_{50} 値 0.0047 及び 0.0067 $\mu g/ml$ である。 一方 *Mosser* 細胞に対する細胞毒活性は、 *B16* - *F10* 及び *HCT-116* の細胞に対するそれよりも弱いものであつた (表 4)。

巨大分子(DNA, RNA及びタンパク質)合成における

るBU-4061Tの阻害作用は、培養B16-F10メラノーマ細胞中で測定された。B16-F10細胞(10⁵細胞/ml)は、該化合物と共に37°Cで4.5時間DNA合成)または4時間(RNA及びタンパク質合成)インキュベーションした。標識前駆体³H-チミジン、¹⁴C-ウリジン、または³H-ロイシンを培養物中に加え、さらに30分間(DNA合成)または60分間(RNA及びタンパク質合成)インキュベーションする。冷却した5%トリクロロ酢酸浴液で洗つた後、腫瘍細胞の酸不溶性の分画中への放射活性の取り込みを液体シンチレーションカウンターによつて測定した。表5に示されているように、DNA合成及びRNA合成に対してかなりの阻害作用を有しているが、10 μg/mlの濃度(最高の試験濃度)においてもタンパク質の分画へのロイシンの取り込みを有意には阻害しなかつた。

-23-

BU-4061Tのin vitroでの抗腫瘍活性を測定するため、雄のBDF₁マウスに0.5mlの10%黒色メラノーマB16ブライ(brai)を腹膜内接種し、雄CDF₁マウスに0.4mlの希釈した10⁶個のリンパ球性白血病細胞P388を含有する腹水を腹膜内接種した。表6及び7に示すように、両実験においてマイトマイシンCを対照化合物として比較して用いた。試験化合物は、マウスに第1日目、第5日目及び第9日目(Q4D×3)または第1日目から第9日目まで(Q1D×9)腹膜内投与された。BU-4061Tは、Q4D×3及びQ1D×9のスケジュールのいずれの処理でもB16メラノーマに対して顕著に優れた抗腫瘍活性を示した。Q1D×9の処理スケジュールで試験した場合、その化合物は最小有効投与量及び最大のT/C値で見た場合にP388システムにおけるよりB16システムでより大きな治療活性を示した。

-24-

表4 マウス及びヒトの腫瘍細胞に対するin vitro

の細胞毒性活性

化合物	IC ₅₀ (μg/ml)		
	B16-F10	HCT-116	Mosser
BU-4061T	0.0047	0.0067	0.17

表5 B16-F10メラノーマ細胞における巨大

分子合成の阻害作用

化合物	IC ₅₀ (μg/ml)		
	DNA	RNA	タンパク質
BU-4061T	16	46	>100

表 6 B16メラノーマに対するBU-4061Tの抗腫瘍活性 (ip)

化合物	投与量 (mg/kg/day)	処理スケジュール (ip)	MST ^{*1} (day)	T/C (%)	第5日目の体重変化 (g)
BU-4061T	1	Q 1 D × 9	19.0	146 ^{*2}	-1.3
	0.5	Q 1 D × 9	19.5	150	-0.5
	0.25	Q 1 D × 9	18.0	138	+0.3
	0.13	Q 1 D × 9	16.0	123	+1.0
	0.063	Q 1 D × 9	15.5	119	+0.3
BU-4061T	4	Q 4 D × 3	16.5	127	-1.0
	2	Q 4 D × 3	17.0	131	-0.5
	1	Q 4 D × 3	15.5	119	+0.5
	0.5	Q 4 D × 3	15.5	119	-0.3
	0.25	Q 4 D × 3	14.5	112	-0.3
マイトマイシンC	3	Q 4 D × 3	28.0	215	-0.3
	1	Q 4 D × 3	18.0	138	-0.8
	0.3	Q 4 D × 3	13.0	100	-0.3
賦形剤のみ	-	Q 4 D × 3	13.0	-	+0.

*1 平均生存時間

*2 円で囲まれたものは顕著な抗腫瘍作用を示している (T/C ≥ 125%)

-26-

表 7 P388白血病に対するBU-4061Tの抗腫瘍活性 (ip)

化合物	投与量 (mg/kg/day)	処理スケジュール (ip)	MST ^{*1} (day)	T/C (%)	第4日目の体重の変化 (g)
BU-4061T	1	Q 1 D × 9	10.5	105	-1.3
	0.5	Q 1 D × 9	13.0	130 ^{*2}	-1.5
	0.25	Q 1 D × 9	11.5	115	-0.3
	0.13	Q 1 D × 9	11.0	110	-0.5
	0.063	Q 1 D × 9	10.5	105	+0.3
マイトマイシンC	1	Q 1 D × 9	17.0	170	-0.8
	0.5	Q 1 D × 9	15.5	155	0.0
	0.25	Q 1 D × 9	13.0	130	+1.0
	0.13	Q 1 D × 9	12.0	120	+1.3
	0.063	Q 1 D × 9	11.0	110	+0.8
賦形剤のみ	-	Q 1 D × 9	10.0	-	+0.8

*1 平均生存時間

*2 円で囲まれたものは、顕著な抗腫瘍作用を示している (T/C ≥ 125%)

-27-

治療学的用途

上記したように *BU-4061T* は哺乳動物の悪性腫瘍に対して顕著な抗腫瘍活性を有している。

本発明の一つの目的は、*BU-4061T* に感受性を有する悪性腫瘍の影響を受けている哺乳動物宿主に *BU-4061T* またはその医薬組成物を投与して治療するにある。

本発明の別の目的は、活性成分として *BU-4061T* を含有し、更には不活性な医薬として許容しうる担体または希釈とからなる医薬組成物、特に腫瘍阻止用の医薬組成物に関する。このような組成物はその他の抗腫瘍剤を含有していてもよく、所望の投与形態に適したあらゆる形態にされていてもよい。そのような組成物の例としては、経口投与用の固体の組成物、例えば錠剤、カプセル剤、丸剤、粉末剤及び顆粒剤、あるいは経口投与用の液体の組成物、

-28-

次なる具体的な記載は、単に本発明を説明するためのものであつて、本発明の範囲を限定する意図はない。

実施例 1.*BU-4061T* の醣酵生産A. フラスコ醣酵

良好に生育した寒天斜面培地の放線菌 *Q996-17* 株を、可溶性でんぶん (*Nickiden Kagaku*) 2%、大豆ミール (*Nikko Seiyu*) 1% 及び $CaCO_3$ 0.5% から成る種菌用培地 (殺菌前の pH 7) 100ml を含有する 500ml のエルレンマイヤーフラスコ中に接種した。接種されたフラスコを回転式振とう機 (200 rpm) 上で 4 日間 32°C でインキュベーションした。5ml の培養物を、種菌用培地と同じ組成を有する生産用培地 100ml を含有する 500ml のエルレンマイヤーフラスコに移した。醣酵を回転式振とう機上で 6 日間～7 日間 28°C で行なつた。

-30-

例えば溶液剤、懸濁剤、シロップ剤またはエリキシル剤、さらには非経口投与のための調製物、例えば無菌溶液、懸濁剤、または乳濁化剤があげられる。それらはまた、使用直前に無菌水、生理的食塩水またはその他の注射することのできる媒体中に溶解されることのできる無菌の固体組成物の形態のものであつてよい。

ある哺乳動物宿主のための最適な *BU-4061T* の投与量等は、当業者にとしては容易に確認できるようなものである。実際の *BU-4061T* の使用投与量は、特定の製剤化された組成物、投与の方法、処理るべき部位、宿主及び病状にしたがつて変えられることは勿論實録されよう。年令、性別、体重、食事、投与時間、投与経路、排泄の速度等、患者の病状、薬物の組合せ、反応性の感度及び病状の深さとといった点を考慮して該薬物の作用を修飾する多くの因子が決められる。

-29-

醣酵プロセス中での抗生物質の生産を *B16* メラノーマ細胞に対する *in vitro* 細胞毒性活性によってモニターした。6 日間の培養でその生産は最大値に達し、その細胞毒性活性は、*MEC* (最小有効濃度) で × 256 倍希釈に達した。

B. タンク醣酵

大量醣酵を、單一コロニー単離法を用いて *Q996-17* 株から誘導せしめられた *Q996-17-A1* 単離体を用いタンクフアーメンテーター中で行なつた。タンク醣酵用の種菌用培養物として、回転式振とう機 (200 rpm) 上で 3 日間 32°C で 25 個のエルレンマイヤーフラスコ (500ml) を培養した。2l の種菌用培養物を、前記生産培地の 120l を含有する 200l のタンクフアーメンテーターに移した。醣酵を 120l/min の通気及び 250 rpm の搅拌下 28°C で行なつた。醣酵プロセス中の細胞毒

性活性は、138時間の醸酵後×1024倍希釈のMBCに達した。

実施例 2.

BU-4061T の抽出及び精製

実施例1の方法に従つて得られた醸酵培地全部(45ℓ, pH 8.3)を激烈に搅拌しながらn-ブタノール(16ℓ)で抽出した。その有機相を連続遠心及び減圧濃縮を用いて分離した。次に濃縮物(1ℓ)をそれぞれ0.7ℓの酢酸エチルで2回抽出した。一緒にされた抽出液を減圧下に濃縮し、油状残りとし、それを搅拌下2ℓのn-ヘキサン中に滴下して加えた。沈降した沈殿物を沪過して集め、乾燥して、*BU-4061T*の粗製固体(29.9g)を得た。水中に懸濁された固体(100mg)をダイアイオン(Diaion)HP-20(Mitsubishi Chem. Industries, Tokyo, φ4.0×70cm)にかけた。水

(3ℓ)、30%メタノール水溶液(3ℓ)、50%メタノール水溶液(3ℓ)及び80%メタノール水溶液で、順次溶出した。*BU-4061T*を含有する分画を、B16メラノーマ細胞に対する細胞毒活性によつて検出を行なつた。80%メタノール水溶液で溶出された活性を有する分画を減圧下濃縮し(4.48g)、残留物をシリカゲルカラム(φ4.0×50cm)上のクロマトグラフィーにかけ、メチレンクロライド/メタノール(98:2v/v)で溶出した。活性な分画を集め、減圧下に濃縮して、淡黄色固体442mgを得た。この固体を少量の酢酸エチルに溶解して、シリカゲルカラム(φ2.2×50cm)にかけ、そのカラムを酢酸エチルで展開して、ほぼ純粋な固体を得た。このものをさらに逆相シリカゲル(φ2.2×30cm)のクロマトグラフィーにかけた。55-60%のメタノール水溶液で溶出して、ほぼ均一な固体の*BU-4061T*(124mg)

を得た。最終的な精製はメタノール溶出による*Sephadex LH-20*カラムクロマトグラフィーによつて行なつた。

目的分画を濃縮して均一な白色粉末の*BU-4061T*(100mg)を得た。

4. [図面の簡単な説明]

図1は、*BU-4061T*(KBr試験剤)の赤外吸収スペクトルを示すものである。

図2は、*BU-4061T*の¹H-NMRスペクトルを示すものである。

図3は、*BU-4061T*の¹³C-NMRスペクトルを示すものである。

FIG. 1
BU-4061T の赤外吸収スペクトル

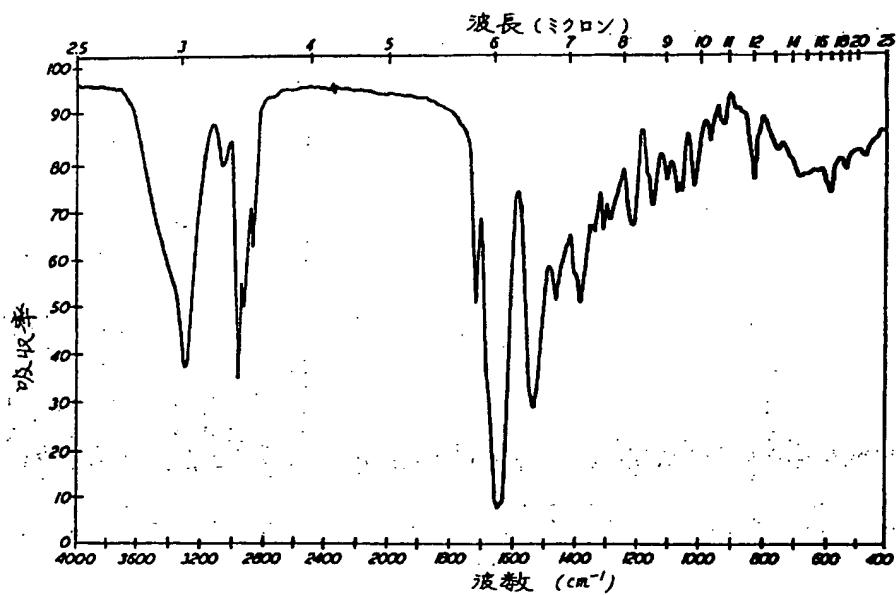
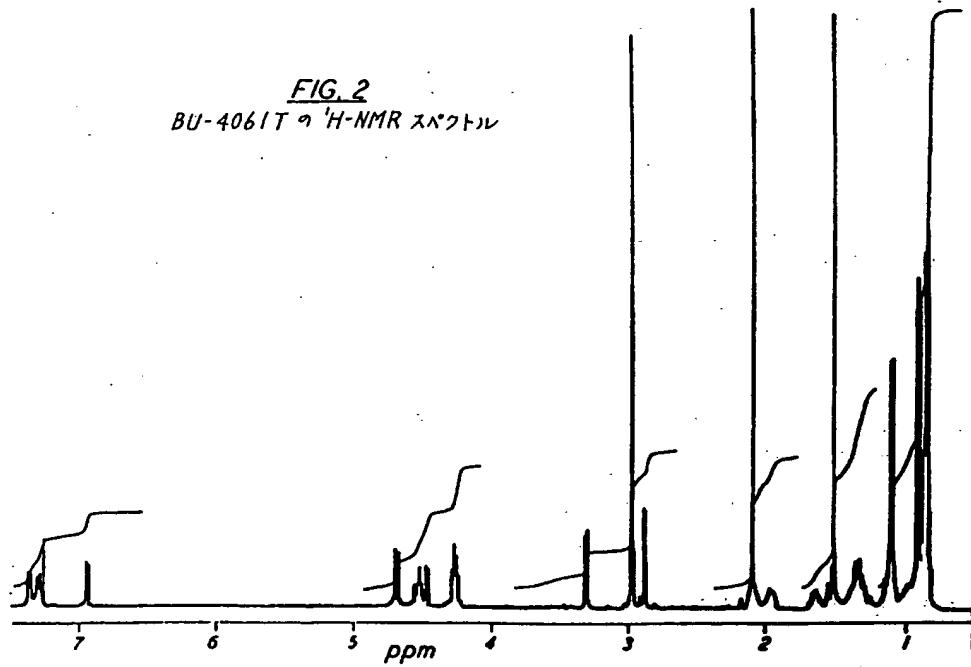
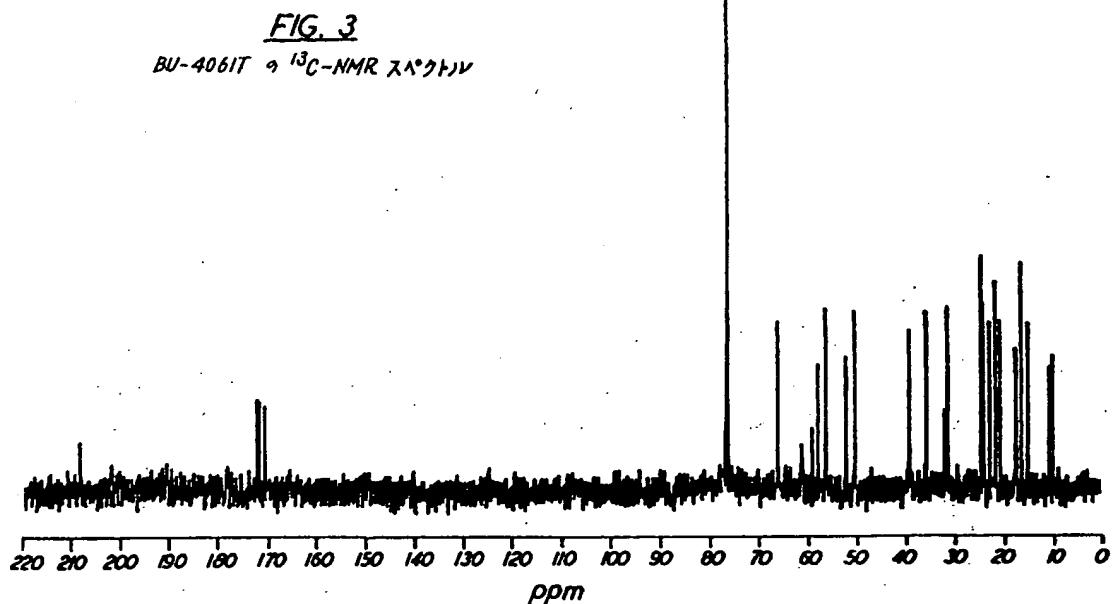


FIG. 2
BU-4061T の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル





手 続 補 正 書

平成 2 年 8 月 30 日

特許庁長官 植 松 敏 殿

1. 事件の表示

平成 2 年 特許願第 205269 号

2. 発明の名称

B U - 4 0 6 1 T

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ブリストルマイヤーズ スクイブ カンパニー

4. 代 理 人

107
住所 東京都港区赤坂 1 丁目 1 番 18 号
赤坂大成ビル (電話 582-7161)

氏名 弁理士 (7175) 斎藤 武彦

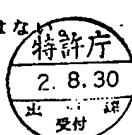


5. 補正の対象

願書に添付の手書き明細書のタイプ添書

6. 補正の内容

別紙のとおり、但し明細書の内容の補正はない。



方 式 審 査 (市 川)